



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Święcickiego 6
60-781 POZNAŃ
www.biolmol.ump.edu.pl

tel: (0-61)8546-513
fax: (0-61)8546-510
e-mail: biolmol@ump.edu.pl

Poznań, dn. 31.01.2020 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Olgi Utyro

pt.: „Hiperhomocysteinemia, dynamika telomerów, markery senescencji, BLMH, GLOD4
i choroba Alzheimerera: badania na ludziach i modelach mysich”

Promotor: Prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Katedra Biochemii i Biotechnologii

Homocysteina (Hcy) w organizmie człowieka powstaje podczas metabolizmu metioniny białkowej dostarczanej w pokarmach. W komórce prawie cała Hcy ulega enzymatycznej remetylacji do metioniny w wyniku działania syntazy metioninowej oraz reakcji transsulfurylacji przy udziale β -syntazy cystationiny (CBS). Jeśli reakcje usuwania homocysteiny zostaną ograniczone, Hcy jest przekształcana do tiolaktonu Hcy, który może być z powrotem zamieniany na Hcy przez jeden z trzech enzymów, np. cytoplazmatyczną hydrolazę bleomycyny (BLMH). N-homocysteinylacja białek może prowadzić do utraty ich funkcji, a nawet tworzenia struktur podobnych do amyloidu. Podwyższony poziom Hcy dotyczy 5-8% populacji. Ciężka hiperhomocysteinemia (HHcy) jest spowodowana genetycznym niedoborem enzymów metabolizmu Hcy, np. CBS, i jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, naczyniowych mózgu i neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera (AD). HHcy może również prowadzić do opóźnienia umysłowego oraz skrócenia czasu życia. Enzym CBS ulega ekspresji w mózgu, wątrobie i trzustce. Mutacje w genie *CBS*, p.I278T oraz p.G307S, prowadzą do substytucji aminokwasów, które znacznie obniżają aktywności CBS, i podwyższenia poziomu Hcy we krwi. W badaniach nad skutkami HHcy wykorzystuje się modele: myszy z usuniętym genem *Cbs* oraz transgeniczną mysz, który zawiera ludzkie białko CBS z mutacją p.I278T. W mózgu myszy transgenicznych

zidentyfikowano podwyższony poziom białka fosfo- τ i β -amyloidu oraz znaczącą degenerację neuronów charakterystyczną dla choroby AD.

Wykazano, że długość telomerów, chroniących końce chromosomów, jest negatywnie skorelowana z wiekiem ludzi i uważa się ją za biomarker starzenia się i główny wyznacznik długości życia. Długość telomerów może być powiązana z senescencją replikacyjną komórki. Do najważniejszych markerów senescencji komórkowej należą: interleukina 6 (IL-6), chemokiny, interleukina 8 (IL-8), białko chemotaktyczne monocytów typu 1 (MCP1), inhibitor proteazy serynowej aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) oraz inhibitor kinaz zależnych od cyklin (p21). Długość telomerów u ludzi również koreluje z poziomem mtDNA, którego nieprawidłowe funkcjonowanie prowadzi do starzenia się organizmu oraz rozwoju chorób takich jak nowotwory.

AD to jedno z najczęstszych schorzeń neurodegeneracyjnych i główna przyczyna demencji u osób starszych. Jest związana z powstawaniem płytek starczych i splątków neurofibrylarnych zawierających β -amyloid i hiperfosforylowane białko τ . W badaniach nad AD często wykorzystuje się modele mysie, które charakteryzują się bardzo szybką akumulacją β -amyloidu w mózgu. W mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera aktywność enzymu BLMH jest znacząco zredukowana w porównaniu do aktywności tego białka w mózgach osób zdrowych. W literaturze znajduje się również doniesienia dotyczące białka zawierającego domenę glioksalazową 4 (GLOD4) w kontekście choroby Alzheimera i zmian zachodzących w mózgu — GLOD4 jest częścią systemu detoksykacji metyloglioksalu w mitochondriach, który jest odpowiedzialny m. in. za glikację białek, wytwarzającą ich niewłaściwą strukturę.

Rozprawa doktorska mgr Olgi Utyro podejmuje próbę wyjaśnienia związku pomiędzy długością telomerów a genotypem z deficytem genu *CBS* (*CBS*^{-/-}) i poziomem homocysteiny u mężczyzn oraz kobiet w różnym wieku oraz grupie kontrolnej. Doktorantka postanowiła również zbadać w leukocytach, tkance wątroby oraz mózgu zależność pomiędzy długością telomerów a poziomem markerów senescencji u myszy *Cbs*^{-/-} i myszy typu dzikiego (WT) w dwóch grupach wiekowych. Wykonano również analizę ilościową i jakościową nowego wytypowanego markera starzenia się u ludzi: mRNA i białka GLOD4 u pacjentów z AD oraz w modelach mysich: *Cbs*^{-/-}, *Blmh*^{-/-}, AD i WT.

Praca doktorska mgr Olgi Utyro napisana została w konwencji klasycznej: liczy 121 stron, w tym 11 stron zajmuje „Wstęp”, 1 stronę „Cel pracy”, 25 stron „Materiały i metody”, 42 strony „Wyniki”, 9 stron „Dyskusja” oraz 1 stronę „Wnioski”. W pracy Autorka

zamieściła 184 pozycje piśmiennictwa, 32 tabele, 20 rycin, 2 strony zawierające skróty oraz 4 załączniki.

We „Wstępie” mgr Olga Utyro opisuje budowę oraz metabolizm homocysteiny oraz jej formy występujące w osoczu krwi obwodowej. Doktorantka szczególnie zwraca uwagę na zjawisko N-homocysteinylacji białek, które może skutkować utratą ich funkcji oraz tworzeniem struktur podobnych do amyloidu. Opisuje przyczyny oraz wpływ hiperhomocysteinemii na rozwój chorób sercowo-naczyniowych, miażdżycy naczyń mózgu, chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba AD. Doktorantka zwraca szczególną uwagę na niedobór CBS u ludzi oraz powiązany z tym defektem obraz kliniczny. We wstępie scharakteryzowano również myszy model niedoboru Cbs oraz myszy model transgeniczny (Tg-I278T) zawierający ludzkie białko CBS z mutacją p.I278T. Ta część pracy zawiera również charakterystykę oraz opis roli biologicznej telomerów z naciskiem na ich długość jako biomarkera starzenia się. We wstępie przedstawiono również mechanizm i markery senescencji komórkowej oraz wpływ mutacji w promotorze genu kodującego białko Klotho na rozwój chorób w modelu mysim. Doktorantka opisała również rolę mtDNA w starzeniu komórkowym. Scharakteryzowała objawy kliniczne, zaburzenia molekularne oraz klasyfikacje choroby AD. Przedstawiła też model myszy choroby AD, a także skutki niedoboru Blmh u myszy oraz scharakteryzowała białko zawierające GLOD4 jako marker rozwoju choroby AD.

Celem pracy było poznanie wpływu zaburzeń metabolizmu homocysteiny na proces starzenia się i neurodegeneracji w chorobie AD. Doktorantka wykorzystała w badaniach grupę ludzi z deficytem CBS, grupę kontrolną oraz modele myszy z niedoborem Cbs, Blmh model myszy choroby AD oraz WT w celu zbadania:

- powiązania długości telomerów ze stężeniem homocysteiny oraz genotypem deficytu CBS w grupie kobiet i mężczyzn w różnym wieku oraz grupie kontrolnej,
- długości telomerów u myszy Cbs^{-/-}, WT i ich zmienności w leukocytach, tkance wątroby i mózgu w dwóch grupach wiekowych myszy,
- poziomu wybranych markerów senescencji u myszy Cbs^{-/-} i myszy WT,
- poziomu mRNA i białka GLOD4 u ludzi z AD oraz modelach mysich Cbs^{-/-}, Blmh^{-/-} AD oraz WT.

Materiały oraz Metody zostały opisane bardzo starannie, a dokumentacja przedstawiona w części wynikowej świadczy o doskonałej znajomości użytych technik

badawczych. Doktorantka uzyskała bardzo wartościowe wyniki, uzupełniające dotychczasową wiedzę dotyczącą wpływu hiperhomocysteinemii na procesy starzenia się oraz procesy neurodegeneracyjne w chorobie AD.

Mgr Olga Utyro, wykorzystując DNA uzyskany od pacjentów z deficytem genotypu *CBS* obu płci, DNA grupy kontrolnej oraz ilościową łańcuchową reakcję polimerazy, wykazała, że genotyp *CBS* i HHcy wpływają na długość telomerów u kobiet. Wynik ten wskazuje na nowy locus ludzkiego genomu, wpływający na długość telomerów. Doktorantka, badając DNA z leukocytów krwi obwodowej, tkanki wątroby i mózgu ilościową łańcuchową reakcją polimerazy, oznaczyła długość telomerów oraz poziom mtDNA u myszy *Cbs*^{-/-}. Zaobserwowała, że myszy *Cbs*^{-/-} oraz myszy WT wykazują podobną długość telomerów. Mgr Olga Utyro wyizolowała RNA z tkanki wątroby i mózgu myszy *Cbs*^{-/-} oraz WT i poddała to RNA reakcji odwrotnej transkryptazy, a następnie ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy i oznaczyła poziom mRNA markerów senescencji. Doktorantka zaobserwowała, że genotyp *Cbs* wpływa na poziom mtDNA oraz poziom markerów senescencji, szczególnie w wątrobie myszy *Cbs*^{-/-}. W badaniach tych zaobserwowano również powiązanie genotypu *Cbs*^{-/-} ze skróceniem długości życia myszy, co mogło być spowodowane zmianą ilości mtDNA i podwyższonym poziomem markerów senescencji, ale nie skracaniem telomerów. Mgr Olga Utyro w swoich badaniach wyizolowała również białko z mózgu pacjentów z AD i mózgów myszy z chorobą AD oraz mózgów myszy *Blmh*^{-/-} i WT. Następnie scharakteryzowała białko GLOD4, wykorzystując dwukierunkową elektroforezę w żelach poliakrylamidowych/ SDS, western blotting, trawienie białek oraz identyfikację białek w spektrometrze masowym. Pozwoliło to Jej zaobserwować oddziaływania między białkami BLMH a GLOD4 w mózgu pacjentów z chorobą AD i mysim modelem choroby AD.

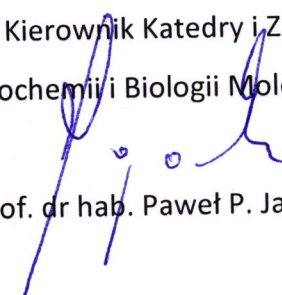
W części „Dyskusja” mgr Olga Utyro umiejętnie omówiła wyniki własnych badań w odniesieniu do danych z literatury światowej. Ten fragment dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Pracę zakończono 5 wnioskami, które są związane z celem pracy. Piśmiennictwo jest obszerne oraz dobrze dobrane. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze dotyczącej powiązania hiperhomocysteinemii ze starzeniem oraz rozwojem zmian neurodegeneracyjnych w chorobie AD.

W trakcie czytania pracy nasuwają się drobne uwagi.

W rozdziale „Wstęp” brakuje opisu roli betainy w przemianie homocysteiny do metioniny. W rozdziale „Materiał ludzki” powinno być: „DNA pacjentów o genotypie CBS^{-/-}”. W rozdziale „Wyniki” Rysunek 5.17 oraz Wykres 5.17 są oznaczone tymi samymi numerami. W rozdziale „Wnioski” ostatni wniosek powinien zostać przeredagowany i mieć przypisaną cyfrę 5. Te drobne uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości pracy. Chciałbym również podkreślić, że pod względem edytorskim praca jest dopracowana i napisana w sposób przejrzysty — wszystkie rozdziały są podzielone na niewielkie podrozdziały, co bardzo ułatwia czytanie i rozumienie tekstu w rozdziałach „Wyniki” i „Dyskusja”. Pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Olgi Utyro podejmuje próbę wyjaśnienia mechanizmów wpływu hiperhomocysteinemii na procesy neurodegeneracyjne w chorobie AD, co może w przyszłości pomóc w opracowaniu następnej generacji leków stosowanych w terapii AD. Wyniki badań przedstawione w pracy zostały częściowo uzyskane podczas wykonywania zadań badawczych projektu PRELUDIUM 9, realizowanego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Praca jest bardzo nowatorska, wnosi nieznane i istotne informacje do nauki światowej oraz spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Całość pracy świadczy o dużej dojrzałości naukowej i wysokich kwalifikacjach naukowych mgr Olgi Utyro.

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Olgi Utyro do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Kierownik Katedry i Zakładu
Biochemii i Biologii Molekularnej

Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński